

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 23 October 2000 (23.10.00)	
International application No. PCT/DE00/00116	Applicant's or agent's file reference k 2778 - sch/msl
International filing date (day/month/year) 07 January 2000 (07.01.00)	Priority date (day/month/year) 08 January 1999 (08.01.99)
Applicant BUB, Sabine et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
04 August 2000 (04.08.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Yolaine CUSSAC Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Juli 2000 (13.07.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/40736 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/70,
C12Q 1/68, C12N 5/10

[DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00116

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Januar 2000 (07.01.2000)

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BUB, Sabine
[DE/DE]; Birkenstrasse 37, D-76661 Philippsburg
(DE). TRÖSTER, Helmut [DE/DE]; Leibnitzstrasse 4,
D-68165 Mannheim (DE). RICHTER, Karsten [DE/DE];
Veilchenweg 20, D-68775 Ketsch (DE). HAKING, An-
gar [DE/DE]; Hauptstrasse 60, D-69214 Eppelheim
(DE). RADDATZ, Stefan [DE/DE]; Wörthstrasse 5,
D-69115 Heidelberg (DE). WIESSLER, Manfred
[DE/DE]; Wilhelm-Mayer-Strasse 2, D-67227 Franken-
thal (DE). SPIESS, Eberhard [DE/DE]; Stahlbühlring
15, D-68526 Ladenburg (DE). TRENDELENBURG,
Michael [DE/DE]; Im Insenhühl 21, D-69221 Dossenheim
(DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

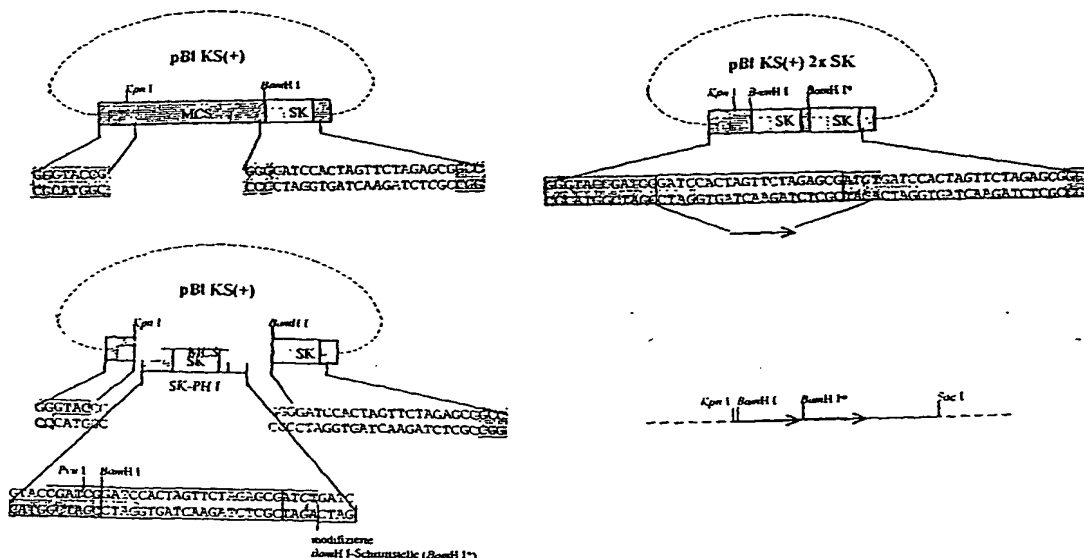
(30) Angaben zur Priorität:
199 00 511.7 8. Januar 1999 (08.01.1999) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US*): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZEN-
TRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MOLECULAR-BIOLOGICAL MARKER FOR ANALYTICAL ELECTRON MICROSCOPY

(54) Bezeichnung: MOLEKULARBIOLOGISCHE MARKER FÜR DIE ANALYTISCHE ELEKTRONENMIKROSKOPIE



(57) Abstract: The invention relates to a plasmid that is characterized in that it is derived from pBluescript KS(+) and that it contains 1, preferably 2, 7, 14, 21 and 27, repetitive SK primer elements. The invention also relates to the use thereof for analytical electron microscopy.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Plasmid, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es sich von pBluescript KS(+) ableitet und mehr als 1, bevorzugt 2, 7, 14, 21 und 27, repetitive SK-Primerelemente enthält, sowie dessen Verwendung in der analytischen Elektronenmikroskopie.



(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Truderinger Strasse
246, D-81825 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 12. April 2001

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten
Fassung: 12. Juli 2001

(15) Informationen zur Berichtigung:
siehe PCT Gazette Nr. 28/2001 vom 12. Juli 2001, Section
II

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

5

10

15

20

25

30

15

Unser Zeichen: K 2778 - sch / msl

6/pts

Molekularbiologische Marker für die analytische Elektronenmikroskopie

Die Erfindung betrifft eine Serie neuer Plasmide auf der Basis von pBluescript KS(+) mit mehr als 1 SK-Primersequenzelement, bevorzugt mit 2, 7, 14, 21 und 27 repetitiven SK-Primersequenzelementen, sowie deren Verwendung als molekularbiologischer Marker für die analytische Elektronenmikroskopie.

Das Electron Spectroscopic Imaging (ESI) ist ein Verfahren der analytischen Elektronenmikroskopie (EM), bei dem die Verteilung eines bestimmten chemischen Elements im untersuchten Präparat bildlich dargestellt wird. Um die strukturellen Organisationen biologischer Systeme zu erhellen, müssen die einzelnen makromolekularen Komponenten optisch unterscheidbar sein. Gegenwärtig wird zur Markierung von Makromolekülen für die Elektronenmikroskopie die Beladung mit Goldpartikeln oder anderen Teilchen verwendet, die im Beugungskontrast sichtbar sind.

Bisher werden Mehrfachmarkierungsexperimente in der Elektronenmikroskopie so durchgeführt, dass man Goldkörner unterschiedlicher Grösse verwendet, um die verschiedenen Zielstrukturen in demselben Präparat unterscheiden zu können. Beispielsweise würde in einem Doppelmarkierungsexperiment ein Molekültyp mit 5nm grossen Goldkörnern, der andere mit 10-20nm grossen gekoppelt werden, um sicher zu sein, dass bei der späteren Auswertung die verschiedenen Moleküle eindeutig lokalisiert und voneinander unterschieden werden können. Grosse Goldkörner (grösser als 10nm) bringen Nachteile mit sich, weil deren Eindringvermögen in Gewebe und deren Kopplungseffizienz an das Zielmolekül reduziert sind (Giberson, R.T., und Demaree, R.S: The influence of immunogold particle size on labeling density. Microscopy Research and

Technique, 27, 355-357, 1994); ausserdem lässt sich eine solch grosse Struktur nicht mehr eindeutig dem Ort der Bindung an die Zielstruktur zuordnen, d.h. man verliert an Auflösungsvermögen. Würde man ein Dreifachmarkierungsexperiment planen, würden sich diese Nachteile besonders stark bemerkbar machen. Eine Alternative zu den Goldkörnern bieten nur sog. Ferritinmoleküle, grosse Proteineinheiten, die Hunderte von Eisenatomen im Zentrum enthalten und an Zielstrukturen koppelbar sind. Deren Elektronendichte und damit die Detektierbarkeit im Transmissionselektronenmikroskop sind allerdings so schlecht, dass ihre Anwendung sich nur in den seltensten Fällen als praktikabel erwiesen hat.

Demgegenüber existieren im Bereich der Lichtmikroskopie seit einiger Zeit Fluoreszenzverfahren, die vergleichsweise problemlos die Dreifachmarkierung, ja sogar die Vierfachmarkierung ermöglichen. Da die Elektronenmikroskopie auf dem Sektor der Markierungstechniken mit der Lichtmikroskopie momentan nicht konkurrieren kann, begnügen sich die Wissenschaftler mit dem vergleichsweise schlechten Auflösungsvermögen der Lichtmikroskope, bevor sie die Nachteile der Markierungstechnologie auf dem elektronenmikroskopischen Sektor in Kauf nehmen. Mit der Entwicklung alternativer Markierungstechniken zur Goldmarkierung würde die Elektronenmikroskopie an Attraktivität gewinnen, weil die Konkurrenzfähigkeit bezüglich der Markierung einherginge mit einem mehr als 100 mal so guten Auflösungsvermögen wie es die Lichtmikroskopie ermöglicht. Als Alternative zum Markierungsverfahren mit Gold für konventionelle Transmissionselektronenmikroskopie, das auf der Elektronendichte des Schwermetalls Gold basiert, besteht ein Bedarf für Markierungsverfahren für ESI. Diese Technik nutzt andere Wechselwirkungen der Strahlelektronen mit den Atomen im Präparat als die konventionelle Transmissionselektronenmikroskopie. Es lassen sich im Prinzip alle Elemente spezifisch nachweisen. Damit erweitert sich der Kreis der Elemente, die für Markierungsverfahren in Frage kommen.

Entscheidend für die Etablierung alternativer Markierungsverfahren ist allerdings die Überprüfung von Detektionslimits für die in Frage kommenden Elemente. D.h. konkret, dass man Informationen über die Anzahl detektierbarer Elementatome pro nm² Fläche im Präparat braucht. Es geht also um die Nachweisgrenzen der ESI-Technik. Zu diesem Parameter gibt es bisher wenig Untersuchungen und ungenaue Angaben. Die ESI-Technik wird zwar häufig genutzt; trotzdem wurden bisher keine Daten zu Detektionsgrenzen veröffentlicht.

10

Es besteht also ein Bedarf nach alternativen Markierungsmöglichkeiten für die Elektronenmikroskopie. Die Detektierbarkeit eines solchen Markerkomplexes sollte leicht getestet und beurteilt werden können.

15

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, eine Möglichkeit bereitzustellen, mit der vor zeitaufwendigen zell- und molekularbiologischen Versuchen Daten erhalten werden können, anhand derer die Aussichten des geplanten Experiments mit dem in Frage kommenden Element bzw. der in Frage kommenden Markerstruktur beurteilt werden können. Ferner soll der Parameter der detektierbaren Anzahl an Elementatomen pro Flächeneinheit messbar werden, um daraus die notwendigen Informationen für die Etablierung von EM-Markierungsverfahren zu erhalten.

20

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der beigefügten Patentansprüche.

Die Ursache für die Notwendigkeit oben erwähnter Vorversuche liegt darin begründet, dass bis heute für die ESI-Detektion der verschiedenen chemischen Elemente keine genauen Grenzwerte der Detektierbarkeit bekannt sind. Der Grund ist unter anderem der, dass die Präparation einer geeigneten Testprobe nicht trivial ist. Eine solche Probe muss besondere Eigenschaften aufweisen. Es muss Bereiche geben, in denen das Zielelement in einer klar definierten Menge vorhanden ist. Diese Bereiche müssen eindeutig zu erkennen sein. In allen übrigen Bereichen

30

35

darf das Zielelement nicht auftreten. Diese Problematik lässt sich anhand der Publikation von Golla, U. und Kohl, H. (Micron, 28 (5), 397-406, 1997) aufzeigen, in der versucht wurde, die Auflösung und die Detektierbarkeit am Beispiel Uran
5 mittels körniger Präzipitate zu dokumentieren.

Erfindungsgemäß wurde eine Serie neuer Plasmide mit mehr als 1, bevorzugt 2, 7, 14, 21 und 27 SK-Primersequenzelementen in direkter Kopf/Schwanz orientierter Repetition auf der Basis
10 von pBluescript KS(+) hergestellt. Das ringförmig geschlossene Plasmid liegt als Zielstruktur vor, in der eine kurze DNA-Sequenz (SK-Primersequenzelement) repetitiv enthalten ist. Das SK-Primersequenzelement umfaßt folgende Sequenz:

15 5'-GATCCACTAGTTCTAGAGCG-3'.

Die SK-Primersequenz stellt einen Abschnitt von 20 Nukleotiden dar, der von der Fa. Stratagene in den von ihnen angebotenen Vektoren pBluescript KS(+/-) sowie Bluescript SK (+/-) so
20 bezeichnet wird und in der "multiple cloning site" (MCS) liegt. pBluescript ist ein Plasmidvektor, der von der Fa. Stratagene verkauft wird. Es handelt sich um ein ringförmiges DNA-Molekül, das die für die Vermehrung in E.coli notwendigen genetischen Informationen enthält. Für die Klonierung von
25 Fremd-DNA-Abschnitten in diesen Vektor entscheidend ist die "multiple cloning site" (MCS). In diese MCS-Region wurden erfindungsgemäß die oben genannten SK-Primersequenz-Repetitionen einbaut, so daß sich die entstehenden Plasmide von pBluescript nur in der MCS unterscheiden, d.h. sich von
30 pBluescript ableiten.

An diese Repetitionssequenz kann eine homologe Sequenz durch Hybridisierung gebunden werden. Trägt diese hybridisierende Sequenz einen Markerkomplex, gelangt durch Hybridisierung der
35 Marker an die Zielstruktur.

Die hybridisierende Sequenz, nachfolgend SK-Oligonukleotid bzw. SKO genannt, kann an den Enden chemisch modifiziert sein,

um eine kovalente Bindung unterschiedlicher Marker zu erlauben. Damit können beliebige Markierungsstrategien untersucht werden. An das SKO kann ein Molekül gekoppelt werden, das ein Element in möglichst hoher Konzentration enthält, dessen Tauglichkeit als Marker für ESI man überprüfen will. Es eignen sich Bor-Marker wie sie beispielsweise in der deutschen Patentanmeldung 198 03 206.4 beschrieben sind. Weitere erfolgversprechende Marker sind Silizium sowie Eisen und Mangan. Die Markerverbindung wird in einer kontrollierten Synthese so aufgebaut werden, dass die Anzahl an Zielelementatomen bekannt ist und das Zielelement in möglichst grosser Menge im Zentrum der Markerverbindung vorliegt. Sie kann ausserdem als Einheit an das SKO gekoppelt werden. Zur Erfüllung dieser Erfordernisse wird beispielsweise die Bor-Markerstruktur so synthetisiert, dass sie wie eine Nukleosid-Einheit in der Oligonukleotidsynthese behandelt wird. Der bevorzugte Weg der Kopplung sieht also die Herstellung einer Borverbindung vor, die die notwendigen Schutzgruppen und Kopplungsgruppen für die Oligonukleotidsynthese nach dem Phosphoramidit-Verfahren enthält, in dessen Verlauf ein Oligonukleotid, vom 3'-Ende zum 5'-Ende hin, Baustein für Baustein, aufgebaut wird. Es besteht dabei die Möglichkeit, daß dazu im letzten Schritt an das 5'-Ende des SKO der Borkomplex alleine oder in Form eines 5'-Bor-Nukleotid(C)-3'-Bausteins angehängt wird (s. dazu auch deutsche Patentanmeldung 19803206.4). Vorteilhaft ist es, wenn der Marker-haltige Baustein einen Abstandhalter (Spacer) enthält, der den Markerkomplex vom SKO abstehen lassen wird, um die Hybridisierung des markierten SKO gegen die komplementären Plasmidbereiche nicht zu behindern. Als Spacer kommen aliphatische Kohlenwasserstoffketten mit Längen zwischen C_2 und C_{10} in Frage, die eventuell Sauerstoffgruppen in Form von Etherbrücken (vorzugsweise maximal 5 Stück) enthalten können (siehe dazu auch deutsche Patentanmeldung 198 03 206.4). In vergleichbarer Weise kann auch mit beliebigen anderen Markerstrukturen, jeweils ein anderes Zielelement enthaltend, verfahren werden.

Die markierten Oligonukleotide werden an die DNA hybridisiert und liegen im Präparat selektiv dort vor, wo die ringförmigen DNA-Moleküle liegen. Je nach Repetitionsgrad der SK-Elemente auf den verwendeten Plasmidmolekülen werden also variable aber definierte Mengen an Zielelementatomen in dichtester Anordnung an der DNA hängen. Man kann deshalb von einer dichtesten Packung ausgehen, weil gefunden wurde, daß die Abstände der Markerstrukturen an der DNA 8 nm betragen. Dies ergibt sich aus der Berechnung der Ausdehnung doppelsträngiger DNA-Bereiche über die in den Plasmiden vorliegenden SK-Repetitionseinheiten. Da die Markerstruktur einen Durchmesser von maximal 5 nm haben wird, bleibt zwar etwas Raum zwischen den Markern frei; dieser Raum sollte allerdings erhalten bleiben, weil die Hydrathülle der Markerverbindungen berücksichtigt werden muss.

Das erfindungsgemäße Plasmid wird gespreitet auf die Trägermatrix des Probenhalters für das ESI präpariert. Die obigen Plasmide erlauben die Präparation einzelsträngiger, ringförmiger Plasmid-DNA-Moleküle nach Infektion plasmidhaltiger *E. coli*-Zellen, bevorzugt *E. coli* JM 110, mit einem sogenannten Helfervirus. Das (+)-Zeichen im Namen des Ursprungsplasmids pBluescript KS (+) gibt an, dass nur der + - Strang des Plasmidmoleküls isoliert wird. Nun steht eine einzelsträngige DNA-Probe zur Verfügung, gegen die, ohne das sonst notwendige Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs, sofort komplementäre DNA-Bereiche hybridisiert werden können. Um gegen den + - Strang der Plasmide komplementäre SK-Oligonukleotide (SKO) zu hybridisieren, müssen diese naturgemäss die Sequenz des - - Strangs darstellen, d.h. 5'-CGCTCTAGAACTAGTGGATC-3'. Ein solches Oligonukleotid kann mittels automatischer Oligonukleotidsynthese hergestellt werden. Diese Moleküle werden in einer wässrigen Lösung mit einem der obengenannten Einzelstrang-Plasmidmoleküle gemischt. Es bilden sich an den Stellen Doppelstrangbereiche, wo die SK-Oligonukleotide (SKO) den komplementären Partner auf der Einzelstrang-DNA gefunden haben, also SK-Oligonukleotid/Plasmid-Hybride (nachfolgend SKOPH genannt). Um die

Bindung der einzelnen SKOs an die DNA nicht zu behindern, wird vorzugsweise als Abstandshalter zwischen den SK-Oligonukleotid-Bindungsstellen die Lücke von 4 Nukleotiden vorgesehen.

5

Diese SKOPHS werden vorzugsweise durch Chromatographie von ungebundenen SKOs getrennt. Dies kann durch Säulenchromatografie geschehen, z.B. werden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) Säulenmatrices angeboten (beispielsweise Sephadex oder Sepharose). Die gesäuberten SKOPHS werden dann einer Spreitung unterzogen. Dabei werden ansonsten geknäuelte DNA-Moleküle so vorbehandelt, dass sie in Lösung gestreckt sind und in diesem Zustand auf mit dünner Folie beschichtete elektronenmikroskopische Trägernetzchen aufgetragen, durch Behandlung mit Schwermetallen sichtbar gemacht und im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) analysiert. Falls eine ESI-Analyse vorgesehen ist, sollte die Schwermetall-Behandlung entfallen, da jedes Element, das in hohen Mengen und/oder Konzentrationen im Präparat vorkommt, den spezifischen Nachweis des Zielelements stört oder unmöglich macht. Die DNA-Ringe werden nun gleichmässig über die Oberfläche des TEM-Präparats verteilt sein und einzeln liegen. Damit sind die obengenannten Grundvoraussetzungen erfüllt: Die ringförmige DNA ist eindeutig erkennbar, an die DNA gebunden liegen die SKOs in mehr oder weniger grosser Zahl vor und zwischen den DNA-Bereichen ist (annähernd) nichts.

20

25

Falls unklar sein sollte, ob die SKOs an die repetitive Region gebunden wurden, bestehen zwei Kontrollmöglichkeiten: a) man verwendet durch Digoxigenin oder Biotin an der 5'-Position markierte SKOs, gegen die ein anti-Digoxigenin oder ein anti-Biotin-Antikörper eingesetzt wird, der selbst goldmarkiert ist und mit herkömmlicher TEM nachweisbar ist; die Goldkorngrösse darf allerdings ca. 6 nm Durchmesser nicht überschreiten (ansonsten könnten sich die Goldkörner gegenseitig behindern); b) evtl. in Kombination mit a) kann das repetitive Zielplasmid durch Restriktionsendonuklease-Verdau neben der repetitiven SK-Region linearisiert werden, so dass nach Spreitung die

30

35

Bindungsorte der SKOs sofort dadurch identifizierbar sind, dass sie am Ende eines fadenförmigen DNA-Moleküls liegen müssen. Da Restriktionsendonukleasen nur Doppelstrang-DNA schneiden, muss man dessen Schnittstelle allerdings zuerst
5 durch Hybridisierung eines um die Schnittstelle herum komplementären Oligonukleotids doppelsträngig machen.

Die repetitiven Sequenzen sind dicht hintereinander angeordnet und erstrecken sich etwa über ein Drittel des Plasmids. Durch
10 diese repetitiven Sequenzen erhöht sich die Signifikanz des Tests stark. Der Vorteil der oben beschriebenen Plasmide besteht darin, dass zwischen einem und 27 der Markereinheiten angehäuft werden können, um so die Zahl an Markerelementatomen zu modulieren. Gelingt es, die markierten SKOPHS in
15 unterschiedlichen Spreitungszuständen von vollständig gestreckt bis geknäuelte im Spreitungspräparat darzustellen, können die Zielelementatome, besonders an geknäuelte DNA-Moleküle gebunden, i) auf engstem Raum konzentriert, ii) wegen der gleichmässig fibrillären Ringform der daran gebundenen DNA
20 lokalisierbar, iii) in definierter, aber variabler Anzahl und iv) in ansonsten elementfreier Umgebung analysiert werden.

DNA-Abschnitte ausserhalb der Repetitionsbereiche, an die kein Marker binden kann, dienen als Negativkontrolle für die ESI-
25 Elementdetektion. Eine solche Negativkontrolle ist notwendig, weil die Spezifität einer errechneten Zielelement-Verteilung angezweifelt werden könnte, wenn man keine Vergleichsregion ohne Zielelement und dementsprechend ohne errechnetes Elementsignal zeigen könnte. Da der Test ein
30 molekularbiologisches System darstellt, erfolgt die Bewertung des Markers in seiner physikalisch-chemischen Umgebung. D.h. auch, dass der Test einer medizinisch/biologischen Anwendung, speziell der *in situ*-Hybridisierung, sehr nahe kommt.

35 Ziel des Testverfahrens ist es, zuverlässige Daten über die für eine ESI-Detektion notwendige Mindestzahl an Zielelementatomen pro Flächeneinheit zu erhalten. Gleichzeitig erhält man Daten über die Einzelerkennbarkeit der

Markerstruktur, weil aufgrund der Repetition derselben eine Mittelung auch schwacher elementspezifischer Signale möglich ist, besonders an DNA-Molekülen, die vollständig ausgestreckt im elektronenmikroskopischen Präparat vorliegen. Somit lässt sich vor einem technisch aufwendigen Einsatz einer Markerstruktur in der Medizin oder Biologie bereits feststellen, ob gegebenenfalls die Zahl oder/und die Konzentration an Zielelementatomen in der Markerstruktur noch erhöht werden muss. Erfahrungsgemäss finden sich in Spreitungspräparaten alle Plasmidzustände von ausgestreckt bis stark geknäuelte, besonders wenn die Spreitung nicht optimal verlaufen ist. Dieser normalerweise unerwünschte Fall ist im Zusammenhang mit der erläuterten Bestimmung der Element-Detektionsgrenzen von Vorteil.

Spreitungsmethoden finden sich mit vielfältigen Variationen in der Literatur (für eine Zusammenfassung s.: Electron Microscopy in Molecular Biology; a practical approach, Sommerville, J. und Scheer, U. (eds.), IRL Press, 1987).

Mit den Standardverfahren der Elementdetektion mittels ESI lassen sich die Schwellenwerte für den elementspezifischen Nachweis ermitteln. Dazu existiert bisher kein anderes Verfahren. Es lässt sich deshalb vorstellen, dass dieses Verfahren auch für solche wissenschaftlich tätigen Personen von Interesse ist, die keine biologisch/medizinische Anwendung im Auge haben, sondern an den Nachweisgrenzen beliebiger anderer als der erwähnten chemischen Elemente interessiert sind. Voraussetzung ist, dass das Zielelement bereits in der an das Oligonukleotid gekoppelten Markerstruktur so konzentriert wie möglich und in möglichst hoher Menge vorliegt.

Die Anwendung für ESI wurde vorstehend ausführlich beschrieben. Daneben sind auch Anwendungen von Teilen des Testsystems möglich, die über die Anwendung in der Elektronenmikroskopie hinausgehen. Zwei weitere Anwendungsbeispiele sind hier kurz erwähnt und werden weiter unten genauer beschrieben: 1) die SK-Primer-Repetitions-kassette

lässt sich mittels Hybridisierung markierter Oligonukleotide
allgemein zur effizienten und lokalisierten DNA-Markierung
nutzen; 2) zur Untersuchung der Mechanismen zur Deletion von
direkten Repetitionen in DNA bilden die nachstehend
5 beschriebenen Plasmide das ideale Substrat.

Über die Anwendung im Bereich der Elektronenmikroskopie
hinaus, bieten, wie vorstehend bereits erwähnt, die genannten
Repetitionsbereiche die Möglichkeit, DNA ganz allgemein auch
10 mit solchen SKO- gekoppelten Markern nach Hybridisierung
detektierbar zu machen, die als Einzelmoleküle noch unterhalb
der Detektionsgrenze liegen, aber in repetitiver Anordnung
nachweisbar werden. Dazu könnten die Repetitionsbereiche auch
in die gewünschten DNA-Moleküle über *Sac* I/ *Kpn* I-kompatible
15 Enden umklont werden. Mit einem solchen Verfahren könnte
beispielsweise der Weg von DNA nach Einführung in eine Zelle
(Transfektion) verfolgt werden. Dabei kommen sowohl licht- als
auch elektronenmikroskopische Anwendungen in Frage.

20 Die chemische Modifizierbarkeit der hybridisierenden Sequenz
erlaubt variable Einsatzmöglichkeiten des Tests für
unterschiedlich konfigurierte Markereinheiten. Da der Test ein
molekularbiologisches System darstellt, erfolgt die Bewertung
des Markers in seiner physikalisch-chemischen Umgebung.
25 Getestet wird die Einzelerkennbarkeit des Markers. Die Stärke
schwacher Signale kann durch Mitteilung genau bestimmt werden.

Die folgenden Ausführungen zur Herstellung der
unterschiedliche Repetitionen enthaltenden Plasmide zeigen,
30 dass für die Versuche zur eigentlichen Elementdetektion für
ESI prinzipiell die Repetitionsstufen (pBluescript KS (+)),
2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 14x, 21x sowie 27x SK zur Verfügung
stehen. Da die Analyse von Unterschieden zur Detektierbarkeit
des Zielelements mit ESI besonders überzeugend ausfallen wird,
35 wenn die Zahl an analysierten Elementatomen stark schwankt (s.
dazu Ausführungen unten), sind die Repetitionsgrade 2x, 7x,
21x und 27x SK von besonderem Interesse.

Wie bereits erwähnt, basiert die vorliegende Erfindung darauf, daß in einem Testpräparat Bereiche vorhanden sind, in denen das Zielelement in einer klar definierten Menge vorhanden und eindeutig zu erkennen ist; in allen übrigen Bereichen darf das Zielelement nicht auftreten.

Die Plasmidkonstruktion wird durch Einschleusung in einen *dam*⁻/*dcm*⁻-Stamm (vorzugsweise *E. coli* JM 110) stabilisiert. JM110 ist *dam*⁻/*dcm*⁻ und enthält ansonsten keine auffälligen genotypischen Marker, die diesen Stamm von den anderen verwendeten deutlich unterscheiden würden, so daß auch diese verwendet werden können. Die Einschleusung der erfindungsgemäßen repetitiven Plasmide in den *dam*⁻/*dcm*⁻-Stamm erfolgt gemäß Standardmethoden (vgl. Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.: Molecular cloning; A laboratory manual; Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Überraschenderweise wird dadurch eine Deletion der direkt repetitiven Elemente während der Bakterienvermehrung vermieden. Es ist nämlich eigentlich bekannt, daß direct repeats oder inverted repeats während der Vermehrung in *E. coli* verloren gehen. *dam*⁻/*dcm*⁻-Stämme sind in der Literatur dokumentiert (vgl. Marinus et al., J. Bacteriol. 114 (3), 1143-1150 (1973)), eine Stabilisierung direkt-repetitiver Sequenzen dadurch wurde jedoch noch nie beschrieben.

In *E. coli* JM110 konnte der Repetitionsgrad sogar auf 27x gesteigert werden. Darüberhinaus ist die Kombination von *E. coli* JM110/pBl KS (+) 27xSK erstmalig ein System, in dem eine ansonsten in *E. coli* instabile direkte Repetitionssequenz vermehrt werden kann. Für Bakteriengenetiker eröffnet sich die Möglichkeit, die zugrunde liegenden Mechanismen dieses Typs von Deletionen in Bakterien zu analysieren und die beteiligten Komponenten zu charakterisieren. Die Frage der Stabilisierung von Repetitionen eines solchen Typs in *E. coli* ist beispielsweise für Klonierungsspezialisten von Interesse, die menschliche DNA-Abschnitte in ihrem Ursprungszustand erhalten wollen, auch wenn diese in *E. coli* vermehrt worden waren (siehe z. B. Human Genome Project). Der Hintergrund ist der,

dass auch in menschlichen DNA-Abschnitten kurze, direkt-repetitive Abschnitte vorkommen, die vergleichbar schlecht stabilisierbar sein können wie die oben geschilderte SK-Primersequenz-Repetition.

5

Die erfindungsgemäßen Plasmide können zu Testkits zur Verwendung in der Elektronenmikroskopie zusammengestellt werden. Ein Testkit enthält z.B. folgende Materialien: 1) kompetente E. coli JM110-Bakterienzellen zur Vermehrung der repetitiven Plasmide; 2) die einzelsträngigen Plasmide 1x oder 2x, 7x, 14x, 21x und 27x SK zur differentiellen Analyse von Markerstrukturen für das Elektronenmikroskop; 3) elektronenmikroskopische Trägernetzchen, die für die Spreitung bereits beschichtet sind; 4) durch Biotinylierung oder Digoxigenierung am 5'-Ende markierte SK-Oligonukleotide, die dazu dienen, die Hybridisierung und Spreitung zu optimieren, indem man mit einem goldgekoppelten anti-Biotin- bzw. anti-Digoxigenin- Antikörper nachweist, dass die repetitive Anordnung am Plasmid tatsächlich vorliegt; 5) eine Vorschrift, die die einzelnen Arbeitsschritte beschreibt. Falls ein Interesse an anderen als den ESI-abhängigen Anwendungen bestehen sollte, kann für solche Interessenten der Testkit modifiziert werden.

10

15

20

25

30

Die Plasmide mit 2, 7, 14, 21 und 27 SK-Primersequenzelementen wurden als E.coli-Kulturen am 22. Dezember 1998 bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Mascheroder Weg 1, Braunschweig unter den Hinterlegungsnummern DSM 12600, DSM 12601, DSM 12602, DSM 12603 und DSM 12604 hinterlegt:

35

pBI KS(+)2xSK	DSM 12600
pBI KS(+)7xSK	DSM 12601
pBI KS(+)14xSK	DSM 12602
pBI KS(+)21xSK	DSM 12603
pBI KS(+)27xSK	DSM 12604

Die folgenden Figuren erläutern die Erfindung näher.

Figur 1: Überblick über die Herstellung von pBl KS(+) 2x SK. Die hier gewählte Art der Darstellung wird in den folgenden Abbildungen dieses Typs fortgeführt. Die Multiple Klonierungsstelle (MCS) ist als dunkelgrauer Block dargestellt, die darin enthaltene SK-Primer-Sequenz ist hellgrau unterlegt. Die Schnittstellen sind mit einer fein unterbrochenen Linie gekennzeichnet. Die detaillierte Sequenz ist von den für die Klonierung wichtigen Abschnitten angegeben.

a) Schematische Darstellung von pBl KS(+). Für die nachfolgende Klonierung wurde pBl KS(+) mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Bam*H I verdaut. Die Restriktionsschnittstellen sind mit einer fein unterbrochenen Linie gekennzeichnet. Das dazwischenliegende MCS-Fragment fällt heraus.

b) Schematische Darstellung des mit *Bam*H I und *Kpn* I verdauten pBl KS(+) und dem SK-PH I-Fragment, das durch Ligation mit pBl KS(+) zu pBl KS(+) 2x SK führen sollte. Durch den Verdau mit *Kpn* I und *Bam*H I wurde ein Teil des MCS herausgetrennt (s. auch a), im Gegenzug wurde das Fragment SK-PH I insertiert. Durch SK-PH I wurde die zuvor vorhandene *Bam* H I-Schnittstelle mittels Modifizierung eines Basenpaares (fette Buchstaben) maskiert und gleichzeitig eine neue *Bam*H I-Schnittstelle eingeführt. Wegen der unterschiedlichen Schnittstellen (*Kpn* I/*Bam*H I) kann das Fragment nur in einer möglichen Orientierung kloniert werden. Die Schnittstelle *Pvu* I diente als Kontrollschnittstelle für den erfolgreichen Einbau des Inserts SK-PH I (keine weiteren Daten dazu gezeigt).

c) Schematische Darstellung von pBl KS(+) 2x SK. pBl KS(+) 2x SK entstand durch die Ligation von SK-PH I mit dem *Bam*H I/*Kpn* I verdauten pBl KS(+) (vgl. b). Die mit Stern gekennzeichnete, modifizierte *Bam*H I-Schnittstelle liess sich mit *Bam*H I nicht mehr schneiden. Zur Vereinfachung im folgenden Text wird die in der Abbildung gekennzeichnete Region (SK-Primer + nicht zu hybridisierende Sequenz) mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Daraus ergibt sich die Schemazeichnung

für pBl KS(+) 2x SK wie unter d) gezeigt.

- d) Vereinfachte Darstellung von pBl KS(+) 2x SK. Durchgezogene schwarze Linie steht für das MCS, die unterbrochene Linie für den verbleibenden Vektor pBl KS(+). Die schwarzen Pfeile zeigen die 5'→3' Richtung der klonierten SK-Primer zuzüglich 4 bp nicht zu hybridisierende Sequenz an (vgl. c).

Figur 2: Vereinfachte schematische Darstellung von pBl KS(+) 7x SK.

Der Vektor pBl ist durch eine unterbrochene, schwarze Linie gekennzeichnet; in seiner *Kpn* I/*Sac* I orientierten MCS sind jetzt sieben SK-Primersequenzen enthalten. Das SK-PH II-Fragment (gestrichelter Pfeil oben und durch Linien hervorgehobene Sequenz "SK-PH II" unten) fügte den siebten SK-Primer und die zusätzliche *Eag* I-Schnittstelle in den Vektor ein. Die wichtigen Sequenzen sind detailliert herausgehoben. Die SK-Primer-Sequenz ist hellgrau unterlegt, das restliche MCS und der 4-Basen-Spacer dunkelgrau. Die Schnittstellen sind in der Sequenz mit fein unterbrochenen, schwarzen Linie gekennzeichnet.

Figur 3: Schematische Darstellung der Klonierung eines pBl2x Block-Plasmids

- a) Insertion eines 7x SK-Blocks in die *Not* I-geöffnete pBl 1x Block-DNA. Die Kennzeichnung der einzelnen Komponenten ist identisch mit denen unter Fig. 1 bzw. Fig. 2. Der Klon pBl 1x Block wurde mit dem Enzym *Not* I linearisiert und mit dem, zuvor mit *Eag* I nachgeschnittenen, PCR-Fragment ligiert. Zur Vereinfachung im weiteren Text werden die sieben SK-Fragmente zu einem grauen Pfeil zusammengefaßt.
- b) Darstellung der Übergänge zwischen einzelnen Blöcken. Die Kennzeichnung der Komponenten ist vergleichbar mit der in Fig. 1.a-d. Durch die Ligation des 7x SK-Block (grauer Pfeil) in der richtigen Orientierung wurde die *Not* I-Schnittstelle, die zuvor pBl 1x Block öffnete, durch das 5'-Ende des neu hinzugekommenen 7x SK-Blocks maskiert

(fette Buchstaben) und durch Not I nicht mehr schneidbar. Das 3'-Ende des Fragments komplettiert die Not I-Schnittstelle in Richtung Vektor. Dadurch wird es in der nächsten Klonierungsrunde möglich, pBl 2x Block wieder mit Not I zu linearisieren, ohne Verlust der 14 SK-Primer. Die BamH I-Schnittstelle am 5'-Ende eines 7x Blocks bleibt, im Gegensatz zu der BamH I-Schnittstelle zwischen den einzelnen SK-Primern im Block (BamH I*), erhalten (BamH I) und kann später als Orientierungskontrolle eingesetzt werden.

Figur 4: Sequenzierungsergebnis des 27 SK-Primerelements enthaltenden Plasmidkonstrukts

Schwarze Balken markieren die SK-Primersequenzbereiche in der von beiden Seiten sequenzierten repetitiven Region. Zwischen diesen SK-Primersequenzbereichen liegen aus klonierungstechnischen Gründen die 4 Basenpaare langen Abfolgen ATCT oder GCCG.

Figur 5: Schema des Markierungsexperiments

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung näher.

Beispiel

Die nachstehend dargestellten Verfahren zur Herstellung der Repetitionen enthaltenden Plasmide sind in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (Molecular cloning; a laboratory manual; second edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) und in Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, 1994-1998) beschrieben, wobei die nachfolgenden Techniken, wie DNA-Vermehrung Restriktionsendonukleasenverdau, Ligation, Agarosegelelektrophorese, PCR dem Fachmann hinreichend bekannt sind und beherrscht werden.

Für die Repetition wurde das SK-Primer-Element von pBluescript

(Fa. Stratagene, Heidelberg) ausgewählt, weil es keine selbst-komplementären oder homooligomeren Bereiche enthält, mit einem G/C-Gehalt von 50% im Durchschnittsbereich natürlicher DNA liegt und klonierungstechnisch zur annähernd lückenlosen Herstellung direkt repetitiver Bereiche günstig ist. Ausserdem ist von Vorteil, daß diese Region mit einem komplementären Sequenzierprimer (mit dem hier beschriebenen SK-Primer identisch) zuverlässig und stabil hybridisiert, da sie von der Firma Stratagene (Heidelberg) als Sequenzierprimer-Bindestelle konzipiert worden ist.

Zum Zweck der Konstruktion von SK-Primersequenzelementen in repetitiver Folge wird ein kurzes Oligonucleotid-Fragment benötigt, in dem die SK-Primersequenz sowie Schnittstellen zur Durchführung der Klonierungen enthalten sind. Hierfür wurden zueinander komplementäre Oligonukleotide synthetisiert. Diese ss-DNA-Fragmente wurden durch Hybridisierung zu klonierbaren ds-Fragmenten umgewandelt, indem die beiden komplementären Oligonukleotide äquimolar in 10 mM Tris-Puffer aneinandergelagert werden. Die Erfolgskontrolle stellt die gelungene Klonierung dar. Die so entstandenen Fragmente wurden SK-PH I (SK-Primer-Hybrid I; Fragment, das für die SK-Primervermehrung von 2-6 SK-Primersequenzen genutzt wurde, vgl. Abb.1) und SK-PH II (SK-Primer-Hybrid II; Fragment, das den siebten SK-Primer und die *Eag* I-Schnittstelle einführte, vgl. Abb.2) genannt.

Für die Herstellung des Plasmids pBl KS(+) (pBluescript KS(+)) mit zwei SK-Primern (pBl KS(+) 2x SK) mußte pBl KS(+) mit *Bam*H I und *Kpn* I geöffnet werden, wobei ein Teil der multiplen Klonierungsstelle MCS entfernt wurde (Abb.1 a). Der vollständige Doppelverdau wurde auf einem 2%-Agarosegel nachgewiesen. Es folgte eine Ethanolfällung. Das Insert SK-PH I (Abb.1b) wurde in einem 10 fachen Überschuß zum geöffneten Vektor zur Ligation gegeben (s. Abb.1 b). Diesen hohen Überschuß konnte man deshalb verantworten, da die 5'-Enden des Fragments nicht phosphoryliert waren, also keine

Oligomere der Inserts entstehen konnten. Mit diesem Ligationsansatz wurde die Transformation in *E. coli*, z.B. XL1-Blue durchgeführt. Von den gewachsenen Kolonien wurde zur Klonierungskontrolle aus drei Klonen die Plasmid-DNA durch Mini-Präparation isoliert. Die so gewonnenen Klone werden nachfolgend pBl KS(+) 2x SK (Abb.1.c) genannt.

Die weitere Klonierung von Plasmiden mit bis zu sieben in gleicher Orientierung enthaltenen SK-Elementen war zeitaufwendig, da jeweils ein Klon aus der letzten Klonierungsrunde als Grundlage für die nächste Klonierung diente. Dementsprechend wurde die Midi-Präp-DNA des ausgewählten pBl 2x SK-Klons wiederum *BamH* I/*Kpn* I doppelverdaut und mit SK-PH I versetzt, ligiert und in *E.coli* XL1-Blue transformiert. Abweichend von der für die Klonierung von pBl 2x SK benutzten Strategie mußte nun in besonderem Maß auf einen effizienten Doppelverdau mit *BamH* I und *Kpn* I geachtet werden. Wie Abb.1.c zeigt, lagen die Schnittstellen, in die ein weiteres SK-PH I-Fragment integriert werden sollte, nämlich nur sechs Basenpaare voneinander entfernt. Ein derartig geringer Abstand zweier Restriktionsschnittstellen läßt die gleichzeitige Restriktion beider Schnittstellen nicht zu. Es mußte dementsprechend nacheinander mit beiden Enzymen geschnitten werden. In dieser Weise wurden die Klonierungen bis zum Plasmid pBl KS(+) 6x SK durchgeführt.

Nach der Klonierung der siebten SK-Primersequenz erfolgte die Vermehrung der repetitiven Elemente blockweise. Dies konnte nur funktionieren, wenn es eine Schnittstelle gab, die den Bereich mit sieben SK-Primern als Einheit vom Vektor trennte. Durch die Ligation des SK-PH II (Abb. 2) in pBl 6x SK wurde dies ermöglicht. SK-PH II brachte neben dem siebten SK-Element die neue Schnittstelle *Eag* I in den Vektor ein. Jetzt wurden die sieben SK-Primer von zwei *Eag* I-Schnittstellen begrenzt (Abb.2) weil der Ausgangsvektor pBl KS(+) bereits eine solche Schnittstelle im MCS mitbrachte.

Zur Beschleunigung der weiteren Klonierungsschritte erfolgte die blockweise Vermehrung der SK-Elemente mittels der Polymerase Chain Reaction (PCR). Als Template-DNA für die Amplifizierung des Fragments mit sieben repetitiven Elementen wurde die Plasmid-Präparation aus XL1-Blue genommen, die direkt aus der Originalkolonie abstammte (pBl 7x SK). Bei der ersten Optimierung der PCR sollte herausgefunden werden, welches Primerpaar das Zielfragment mit der besten Qualität und Quantität amplifizierte. Es wurden die Primer M13, M13 reverse, T3 und T7 (M13: TGTAACGACGGCCAGT; M13 reverse: CAGGAAACAGCTATGACC; T3: AATTAACCTCACTAAAGGG; T7: TAATACGACTCACTATAGGG) in verschiedenen Kombinationen miteinander ausgetestet. Alle diese Primer hatten ihre Bindungsstellen außerhalb der MCS, entweder nahe des β -Galaktosidase Startpunkts oder nahe der T7-Transkriptions-Startstelle in pBluescript KS (+). Die PCR fand unter Standardbedingungen statt. Die verschiedenen Ansätze enthielten die zueinander passenden Primer in den verschiedenen möglichen Kombinationen: M13/M13 reverse, T7/T3, T7/M13 reverse und T3/M13. In der Negativkontrolle waren alle vier Primer ohne das Template vereinigt. Da der PCR-Ansatz mit T3/T7 die besten Ergebnisse lieferte, wurde dieses Primerpaar für die PCR gewählt.

Um das mittels PCR gewonnene Insertfragment in den mit *NotI* geöffneten Vektor ligieren zu können, mußte es "sticky ends" besitzen, die mit *Not I* kompatibel waren. Hierfür mußte das PCR-Fragment, das die sieben SK-Primer enthielt, an den Rändern nachgeschnitten werden. Das Restriktionsenzym *Eag I* verkürzte das 246 bp lange PCR Fragment, dessen Ränder die Sequenzen der Primer T3/T7 abschlossen, um 47 und um 51 bp auf der anderen Seite. Mit einem 2,2 %igen Gel konnte dieser Unterschied zur Kontrolle noch sichtbar gemacht werden. Mit dem durch die PCR amplifizierten 7x SK-Fragment, dessen Ränder durch den *Eag I*-Verdau zu *Not I* kompatibel wurden, wurde pBl KS(+) 7x SK in nur einem Schritt zu pBl KS(+) 14x SK. Für einen Überblick der Klonierungsweise siehe Abb.3. Das verdaute Fragment wurde vor der Ligation durch den PCR-Purification Kit

(Fa. Qiagen) gereinigt. Dies sollte die nicht in der PCR-Reaktion verbrauchten Primer und die durch den Verdau entstandenen Bruchstücke entfernen.

5 Gegenüber den ersten Klonierungsschritten, die zu
pBl KS(+) 7x SK führten, wurde der Vektor nicht mit zwei
verschiedenen Enzymen (Kpn I/BamH I vgl. Abb 1) geöffnet
sondern mit *Not* I linearisiert. Deshalb mußte mit einer
Häufung an Religationen gerechnet werden. Bei dieser
10 Klonierung konnte einer Religation nicht durch eine vielfach
erhöhte Insertkonzentration (7x SK-Fragment) entgegengewirkt
werden, da die DNA-Blöcke an den 5'-Enden phosphoryliert waren
und mit unkontrollierbaren Oligomerisierungen der Insert-DNA
zu rechnen war. Die Religationen wurden deshalb durch eine
15 Dephosphorylierung des Vektors reduziert oder sogar
verhindert. Im Verlauf der weiteren Ausführungen wird die
bisher pBlKS(+)7xSK genannte DNA als pBl 1xBlock bezeichnet.

20 Der mit *Not* I geöffnete pBl 1x Block wurde mit dem gereinigten
PCR-Fragment ligiert, das ebenfalls sieben SK-Primer enthielt.
Dies wurde durch die am Rand der repetitiven Elemente
befindlichen einzigen *Not* I-Schnittstelle möglich, durch die
der pBl 1x Block linearisiert wurde. Das PCR-Fragment wurde,
wie oben erwähnt, mit dem zu *Not* I kompatiblen Enzym *Eag* I
25 nachgeschnitten und direkt an die sieben SK-Primer des Vektors
ligiert (pBI 2x Block).

30 Da sich pBl 7x SK im Wirtsstamm JM110 als stabil erwies, wurde
auch der Ligationsansatz des Plasmids mit 14 SK-Elementen in
diesen Stamm transformiert. Die Transformation von
pBl KS(+) 14x SK in JM110 brachte 118 Transformanten hervor.
Dies entsprach einer Transformationsrate von $1,7 \times 10^3$ cfu
(colony forming units)/ μ g DNA.

35 Es wurde weiter mit schrittweiser Vermehrung gearbeitet, in

diesem Fall mit dem Ziel, mit den 7x SK-Blöcken ein Plasmid mit 28 repetitiven SK-Primersequenzen aufzubauen. Hierfür wurde, analog wie in Abb. 3 gezeigt, pBl 2x Block mit Not I linearisiert. Der vollständige Verdau wurde auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft. Die 5'-Enden dieses mit Not I geöffneten Plasmids wurden dephosphoryliert und mit dem 7x SK-Block ligiert. Aus der Transformation resultierten sieben Kolonien.

Der Kontrollverdau mit BamH I mehrerer Kandidaten-Klone ergab, daß ein kompletter 7x SK-Block zusätzlich inseriert worden war. Einer der Klone wurde für eine Midi-Präparation vermehrt und die DNA präpariert. Die Sequenzanalyse aus dieser Midi-Präparation bewies die komplette und korrekte Sequenz von 21 SK-Primern mit den funktionsfähigen Schnittstellen, die für die nächste Klonierung benötigt wurden. Die Gelanalysen wurden dabei bestätigt. Dieser Klon wird im folgenden Text mit pBl 3x Block bezeichnet. Er diente als Vorstufe für die nächste Insertionsrunde.

Um zu einem Plasmid mit 28 repetitiven SK-Elementen zu gelangen, wurde die blockweise Vermehrung des 7x SK-Blocks fortgeführt. Als Ausgangsplasmid dieser Klonierung wurde pBl 3x Block eingesetzt. Diese Klonierung wurde wie die beiden vorangegangenen behandelt. pBl 3x Block wurde mit Not I linearisiert, auf vollständigen Verdau in einem 1 %igen Agarosegel überprüft und danach dephosphoryliert. Der dephosphorylierte Vektor wurde zusammen mit dem in der PCR amplifizierten und nachgeschnittenen 7x SK-Block in einen Ligationsansatz eingesetzt. Die Kontrolligation zur Beurteilung der Dephosphorylierung erbrachte 2 Klone. Bei der Transformation der Ligation mit Insert entwickelten sich 59 Klone, davon wurden 16 Kolonien für eine Mini-Präparation ausgewählt. Die Auftrennung mit einem Agarosegel nach einem Sac I/Kpn I-Verdau erfolgte wie gewöhnlich auf einer 2,2 %igen Gelmatrix.

Insgesamt 5 Klone wiesen verlängerte Insertbereiche auf. Kontrollverdaus mit BamH I sowie Dreifachverdaus mit Sac I/Kpn I/BamH I zeigten Fragmentemuster, die darauf hindeuteten, dass kein kompletter 7x SK-block hinzugekommen sein dürfte. Stattdessen musste bei der Klonierung eine BamHI-site im neu hinzugekommenen Block deletiert worden sein.

Von den fünf sich gleichenden Klonen wurde einer ausgewählt und mit seiner midi-präparierten DNA eine Sequenzanalyse durchgeführt. Die Sequenzierung bestätigte das Ergebnis, daß die neu dazugekommene BamH I-Schnittstelle deletiert war. Es fehlte der komplette SK-Primer mit intakter BamHI-Schnittstelle des zuletzt hinzugekommenen 7x SK-Blocks. Das Ergebnis war also ein pBl KS(+) Plasmid mit 27x SK Primern. Die Sequenz dieses Klons ist in Figur 4 gezeigt.

Patentansprüche

- 5 1) Plasmid, dadurch gekennzeichnet, daß es sich von
pBluescript KS(+) ableitet und mehr als 1 repetitives
SK-Primersequenzelement enthält.
- 10 2) Plasmid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
es 2, 7, 14, 21 oder 27 repetitive SK-
Primersequenzelemente enthält.
- 15 3) Plasmid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, daß die Primersequenzelemente einen
Markerkomplex tragen.
- 20 4) Plasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch
gekennzeichnet, daß das SK-Primersequenzelement
folgende Sequenz umfaßt:
5'-GATCCACTAGTTCTAGAGCG-3'
- 25 5) Plasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch
gekennzeichnet, daß daran SK-Oligonukleotide gebunden
werden können, die an ihren Enden durch ein im
Elektronenmikroskop detektierbares Element modifiziert
sind.
- 30 6) Plasmid nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß
die Elemente ausgewählt sind aus Bor, Silizium, Eisen,
oder Mangan.
- 35 7) Verwendung eines Plasmids nach einem der Ansprüche 1
bis 6 in der analytischen Elektronenmikroskopie.
- 8) E. coli Zellen, transformiert mit einem Plasmid nach
einem der Ansprüche 1 bis 6.
- 9) E. coli Zellen nach Anspruch 8, dadurch

gekennzeichnet, daß es sich um E. coli JM110 handelt.

10) Testkit zur Verwendung in der Elektronenmikroskopie,
umfassend mindestens die

5 folgenden Komponenten:

- kompetente E. coli JM110-Bakterienzellen zur
Vermehrung eines Plasmides nach einem der
Ansprüche 1 bis 5,

10 - einzelsträngige Plasmide umfassend 2x, 7x, 14x, 21x
und 27x SK.

Zusammenfassung

5 Molekularbiologische Marker für die analytische Elektronenmikroskopie

Die Erfindung betrifft ein Plasmid, das dadurch gekennzeichnet
ist, daß es sich von pBluescript KS(+) ableitet und mehr als
10 1, bevorzugt 2, 7, 14, 21 und 27, repetitive SK-Primerelemente
enthält, sowie dessen Verwendung in der analytischen
Elektronenmikroskopie.

15

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts k 2778 - sch/msl	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/00116	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/01/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 08/01/1999

Anmelder

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.
- ☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/70 C12Q1/68 C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND, GENSEQ, MEDLINE, CHEM ABS Data, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY ABS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>ALEXEYEV MIKHAIL F ET AL: "Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for Escherichia coli vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis." GENE (AMSTERDAM), Bd. 160, Nr. 1, 1995, Seiten 63-67, XP004042179 ISSN: 0378-1119 Abbildung 2</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-6,8-10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung befragt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Juli 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

31/07/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

ALCONADA RODRIG..., A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>GUPTA S C ET AL: "BIOLOGICAL LIMITATIONS ON THE LENGTH OF HIGHLY REPETITIVE DNA-SEQUENCES THAT MAY BE STABLY MAINTAINED WITHIN PLASMID REPLICONS IN ESCHERICHIA-COLI" BIO-TECHNOLOGY, Bd. 1, Nr. 7, 1983, Seiten 602-609, XP000923174 Seite 605; Abbildungen 6,7</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-6,8-10
Y	<p>KEMPE T ET AL: "MULTIPLE-COPY GENES PRODUCTION AND MODIFICATION OF MONOMERIC PEPTIDES FROM LARGE MULTIMERIC FUSION PROTEINS" GENE (AMSTERDAM), Bd. 39, Nr. 2-3, 1985, Seiten 239-246, XP000915163 ISSN: 0378-1119 Seite 242; Abbildung 2</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-6,8-10
Y	<p>HOFER V: "CONSTRUCTION AND STABILITY OF A SIXFOLD REPEATED ARTIFICIAL GENE" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 167, Nr. 2, 1987, Seiten 307-313, XP000864686 ISSN: 0014-2956 Seite 307, rechte Spalte Seite 310 -Seite 311, linke Spalte Abbildung 3 Tabelle 2</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-6,8-10
A	<p>MALECKI MAREK: "Preparation of plasmid DNA in transfection complexes for fluorescence and electron spectroscopic imaging." SCANNING MICROSCOPY SUPPLEMENT, Nr. 10, 1996, Seiten 1-16, XP000864688 ISSN: 0892-953X Seite 12; Abbildung 7</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>HENDZEL M J ET AL: "Probing nuclear ultrastructure by electron spectroscopic imaging." JOURNAL OF MICROSCOPY (OXFORD), Bd. 182, Nr. 1, 1996, Seiten 1-14, XP000864717 ISSN: 0022-2720</p> <p style="text-align: center;">---</p>	

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>QUALMANN B ET AL: "Electron spectroscopic imaging of antigens by reaction with boronated antibodies." JOURNAL OF MICROSCOPY (OXFORD), Bd. 183, Nr. 1, 1996, Seiten 69-77, XP000864685 ISSN: 0022-2720 das ganze Dokument</p> <p>----</p>	
A	<p>KESSELS M M ET AL: "Immunocytochemistry by electron spectroscopic imaging using well defined boronated monovalent antibody fragments." SCANNING MICROSCOPY SUPPLEMENT, Nr. 10, 1996, Seiten 327-344, XP000864687 ISSN: 0892-953X das ganze Dokument</p> <p>----</p>	
A	<p>BENDAYAN M ET AL: "ELECTRON SPECTROSCOPIC IMAGING FOR HIGH-RESOLUTION IMMUNOCYTOCHEMISTRY USE OF BORONATED PROTEIN A" JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, Bd. 37, Nr. 5, 1989, Seiten 573-580, XP000864698 ISSN: 0022-1554 das ganze Dokument</p> <p>----</p>	
A	<p>US 5 595 878 A (SOOD ANUP ET AL) 21. Januar 1997 (1997-01-21)</p> <p>----</p>	
P,X	<p>DATABASE GENEMBL 'Online! 2. Februar 1999 (1999-02-02) TROESTER,H.: "Artificial sequence, fragment from B1 KS(+)27xSK containing SK primer elements" XP002142080 Accession Y18352</p> <p>-----</p>	1-6,8-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/00116

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5595878	A	21-01-1997	NONE

Transla of the International Search Report

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No: PCT / DE 00/00116

A. Classification of Subject Matter

IPC 7 C12N15/70 C12Q1/68 C12N5/10

According to international Patent Classification (IPC) or to both National Classification

B. Fields Searched

Minimum Documentation Searched (Classification System and Classification Symbols)

IPC 7 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched.

Electronic Database consulted during the international search (name of database and, if appropriate, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, GENSEQ, MEDLINE, CHEM, ABS Data, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY ABS, EMBASE

C. Documents considered to be relevant

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages.	Relevant to Claim No.
Y	ALEXEYEV MIKHAIL F ET AL: "Improved antibiotic resistance gene cassettes and omega elements for Escherichia coli vector construction and in vitro deletion / insertion mutagenesis." GENE (AMSTERDAM) Vol. 160, No. 1, 1995, Pages 63-67, ISSN: 0378-1119 Fig. 2	1-6,8-10
Y	GUPTA S C ET AL: "BIOLOGICAL LIMITATIONS ON THE LENGTH OF HIGHLY REPETITIVE DNA- SEQUENCES THAT MAY BE STABLY MAINTAINED WITHIN PLASMID REPLICONS IN ESCHERICHIA -COLI" BIO-TECHNOLOGY Vol. 1, No. 7, 1983, Pages 602-609 XP000923174 Page 605; Figs. 6,7	1-6, 8-10
Y	KEMPE T ET AL: "MULTIPLE-COPY GENES PRODUCTION AND MODIFICATION OF MONOMERIC PEPTIDES FROM LARGE MULTIMERIC FUSION PROTEINS " GENE (AMSTERDAM) Vol. 39, No. 2-3, 1985, Pages 239-246, XP000915163 ISSN: 0378-1119 Page 242; Fig.2	1-6, 8-10
Y	HOFFER V "CONSTRUCTION AND STABILITY OF	1-6, 8-10

	A SIXFOLD REPEATED ARTIFICIAL GENE " EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Vol. 167, No. 2, 1987, Pages 307-313 XP000864686 ISSN: 0014-2956 Page 307, right hand column. Page 310 - 311, left hand column. Fig. 2 Table 2	
A	MALECKI MAREK: "Preparation of plasmid DNA in transfection complexes for fluorescence and electron spectroscopic imaging." SCANNING MICROSCOPY SUPPLEMENT, No. 10, 1996, Pages 1-16, XP000864688 ISSN: 0892- 953X Page 12, Fig. 7	
A	HENDZEL M J ET AL: "Probing nuclear ultrastructure by electron spectroscopic imaging ." JOURNAL OF MICROSCOPY (OXFORD), Vol. 182, No. 1, 1996, Pages 1-14, XP0000864717 ISSN: 0022-2720	
A	QUALMANN B ET AL: "Electron spectroscopic imaging of antigens by reaction with boronated antibodies." JOURNAL OF MICROSCOPY (OXFORD), Vol. 183, No. 1, 1996, Pages 69-77, XP000864685 ISSN: 0022-2720 whole document	
A	KESSELS M M ET AL: "Immunocytochemistry by electron spectroscopic imaging using well defined boronated monovalent antibody fragments." SCANNING MICROSCOPY SUPPLEMENT, No. 10, 1996, Pages 327-344, XP000864687 ISSN: 0892-953X whole document	
A	BENDEYAN M ET AL : "ELECTRON SPECTROSCOPIC IMAGING FOR HIGH RESOLUTION IMMUNOCYTOCHEMISTRY USE OF BORONATED PROTEIN A " JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY Vol. 37, No. 5, 1998, Pages 573-580, XP000864698 ISSN: 0022-1554 Whole document	
A	US 5 595 878 A (S00D ANUP ET AL) 21. January 1997 (1997-01-21)	
P,X	DATABASE GENEMBL 'Online ! 2. February. 1999 (1999-02-02) TROESTER, H.: "Artificial sequence, fragment from B1 KS (+) 27xSK containing SK primer elements " XP002142080 Accession Y18352	1-6, 8-10

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion International Search 14 July 2000.

Date of Mailing the International Report 31/07/2000

Name and address of the international searching authority

European Patent Office, PO Box 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorised Officer

ALCONADA RODRIG, A

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS


PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 26 APR 2001

47

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts k 2778 - sch/msl		WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00116	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 07/01/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 08/01/1999	
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/70			
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.			
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p>			
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none">I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des BerichtsII <input type="checkbox"/> PrioritätIII <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche AnwendbarkeitIV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der ErfindungV <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser FeststellungVI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte UnterlagenVII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen AnmeldungVIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung			
Datum der Einreichung des Antrags 04/08/2000		Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.04.2001	
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Bevollmächtigter Bediensteter Kalsner, I Tel. Nr. +49 89 2399 8708	



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-20 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-10 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00116

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-10
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-10
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-10
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

**Zu Abschnitt V: Begründete Feststellung hinsichtlich Neuheit, erfinderischer
Tätigkeit und gewerblicher Anwendbarkeit**

Die vorliegende Internationale Anmeldung betrifft Plasmide, die von pBlueskript KS(+) abgeleitet sind und dahingehend modifiziert wurden, daß sie das SK-Primersequenzelement mehrfach enthalten. Diese Plasmide werden in der analytischen Elektronenmikroskopie verwendet.

Desweiteren werden E. coli Zellen, die mit diesen Plasmiden transformiert wurden, und ein Testkit zur Verwendung in der Elektronenmikroskopie, der diese Plasmide enthält, beansprucht.

Ein Plasmid, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es sich von pBlueskript KS(+) ableitet und mehr als ein repetitives SK-Primerelement enthält ist weder im vorhandenen Stand der Technik offenbart noch daraus in offensichtlicher Weise ableitbar.

Anspruch 1 und die davon direkt oder indirekt abhängigen **Ansprüche 2-6 und 8-10** entsprechen daher den Erfordernissen von Art. 33(2)(3) PCT.

Die Verwendung des erfindungsgemäßen Plasmids in der analytischen Elektronenmikroskopie (**Anspruch 7**) ist ebenfalls als neu und erfinderisch im Sinne von Art. 33(2)(3) PCT anzusehen.

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

914397
506
Translation

Applicant's or agent's file reference k 2778 - sch/msl	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/00116	International filing date (day/month/year) 07 January 2000 (07.01.00)	Priority date (day/month/year) 08 January 1999 (08.01.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/70		
Applicant DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 04 August 2000 (04.08.00)	Date of completion of this report 11 April 2001 (11.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/00116

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-20 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-10 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/6-6/6 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

DE 00/00116

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The present international application concerns plasmids derived from pBlueskript KS(+) and modified in such a way that they contain the SK-primer sequence element repeated several times. These plasmids are used in analytical electron microscopy.

Also claimed are *E. coli* cells transformed with these plasmids and a test kit for use in electron microscopy containing these plasmids.

The available prior art neither discloses nor suggests in an obvious way a plasmid characterised in that it is derived from pBlueskript KS(+) and contains more than one repetitive SK primer element.

Claim 1 and its directly or indirectly dependent **Claims 2-6 and 8-10** therefore meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).



The use of the claimed plasmid in analytical electron microscopy (**Claim 7**) should also be considered novel and inventive (PCT Article 33(2) and (3)).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference K 2778-sch/msl		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/00116	International filing date (day/month/year) 07/01/2000	Priority date (day/month/year) 08/01/1999	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/70			
Applicant DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM . et al .			
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 0 sheets.</p>			
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application 			
Date of submission of the demand 04/08/2000		Date of completion of this report 11.04.2001	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Kalsner, I Telephone No. +49 89 2399 8708 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/DE00/00116

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

Description, pages:

1-20 as originally filed

Claims, No.:

1-10 as originally filed -

Drawings, sheets:

1/6-6/6 as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/DE00/00116

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

- V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/DE00/00116

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-10
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-10
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-10
	No:	Claims	

**2. Citations and explanations
see separate sheet**

Concerning Section 5:

Reasoned Statement concerning Novelty, Inventive Step and Industrial Applicability

The instant international application concerns plasmides which are derived from pBlueskript KS(+) and modified such that they contain the SK primer sequence element several times. These plasmides are used in analytic electron microscopy.

Furthermore E.coli cells, which are transformed with these plasmides, and a test kit containing these plasmides for use in electron microscopy are claimed.

A plasmide which is characterised in that it is derived from pBlueskript KS(+) and contains more than one repetitive SK primer element is neither described in the available prior art nor is derivable therefrom in an obvious manner.

Claim 1 and the directly or indirectly dependent **claims 2-6 and 8-10** are therefore in accordance with the requirements of Art. 33(2) (3) PCT.

The use of the inventive plasmides in analytic electron microscopy (**claim 7**) is also to be seen as new and inventive in accordance with Art. 33 (2) (3) PCT.